

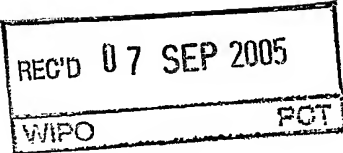
专 利 合 作 条 约

PCT

专利性国际初步报告

(PCT 第II章)

(PCT 36 和细则 70)

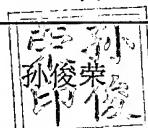


申请人或代理人的档案号 PCT03103	关于后续行为 参见 PCT/IPEA/416 表	
国际申请号 PCT/CN 2003/001092	国际申请日(日/月/年) 19.12 月 2003 (19.12.2003)	优先权日(日/月/年)
国际专利分类(IPC)或者国家分类和 IPC 两种分类 IPC ⁷ C12P7/62,C08G63/66/(C12P7/62,C12R1:05 C12R1:38)		
申请人 宁波天安生物材料有限公司 等		

1. 本报告是国际初步审查单位根据条约 35 做出的国际初步审查报告, 并依照条约 36 将其传送给申请人。
2. 本报告共计 3 页, 包括扉页。
3. ☒ 本报告还有附件,
 - a. ☒ (传送给国际局和申请人)共计 7 页, 包含
☒ 修改后的并且作为本报告基础的说明书修改页、权利要求书修改页和/或附图修改页, 和/或对
 本国际初步审查单位所做出的更正页(见 PCT 细则 70.16 和行政规程 607)。
☐ 国际初步审查单位认为修改超出原始公开范围的取代页, 参见第 I 栏第 4 项和补充栏。
 - b. ☐ (传送给国际局) 共计 (指明电子载体的类型和数量) _____, 包含有在与序列表有关的补充栏中
 指明的电子形式的序列表和/或与其相关的表格。(行政规程 802)

4. 本报告包括关于下列各项的内容:

- I ☒ 报告的基础
- II ☐ 优先权
- III ☐ 不做出关于新颖性、创造性和工业实用性的意见
- IV ☐ 缺乏发明的单一性
- V ☒ 按条约 35(2)关于新颖性、创造性或工业实用性的理由; 支持这种意见的引证和解释
- VI ☐ 引用的某些文件
- VII ☐ 国际申请中的某些缺陷
- VIII ☐ 对国际申请的某些意见

提交要求书的日期 18.7 月 2005 (18.07.2005)	完成本报告的日期 03.8 月 2005 (03.08.2005)
中华人民共和国国家知识产权局 IPEA/CN 中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088) 传真号: (86-10) 62019451	受权官员  电话号码 (86-10): 62085056

I. 报告的基础

1. 关于语言, 本报告将基于:

☒ 申请提出时使用的语言。

☐ 该申请的_____语言译文, 提供该种语言的译文是

☐ 为了国际检索而提交的译文所使用的语言(细则 12.3 和 23.1(b))。

☐ 为了国际申请的公布而提交的译文所使用的语言(细则 12.4)。

☐ 为了国际初步审查而提交的译文所使用的语言(细则55.2和/或55.3)。

2. 关于国际申请中各个部分, 本报告基于(申请人为答复受理局根据条约 14 所发通知而提交的替换页, 在本报告中视为“原始提交”的文件, 不作为本报告的附件)

☐ 原始提交的国际申请。

☒ 说明书, 第_____页 原始提交的,
第 1-6_____页 2005 年 7 月 18 日 初审单位收到的,
第_____页 _____ 初审单位收到的。

☒ 权利要求, 第_____项, 原始提交的,
第_____项, 按条约 19 条修改的(附有说明),
第 1-9_____项 2005 年 7 月 18 日 初审单位收到的,
第_____项 _____ 初审单位收到的。

☐ 附图, 第_____页, 原始提交的。
第_____页*, _____ 初审单位收到的,
第_____页*, _____ 初审单位收到的。

☐ 序列表和/或相关表格——参见与序列表有关的补充栏。

3. 修改导致以下内容的删除:

☐ 说明书, 第_____页
☐ 权利要求, 第_____项
☐ 附图, 第_____页, 图_____
☐ 序列表(具体说明)_____
☐ 与序列表相关的表格(具体说明)_____

4. ☐ 由于本报告附件的(某些)修改, 如下所列, 被认为超出了原始公开的范围, 如补充栏所示, 因此本报告是按照没有修改的情况做出的(细则 70.2(c))。

☐ 说明书, 第_____页
☐ 权利要求, 第_____项
☐ 附图, 第_____页, 图_____
☐ 序列表(具体说明)_____
☐ 与序列表相关的表格(具体说明)_____

*如果第 4 项适用, 一些或全部的文件页可能做出“被取代”标记。

专利性国际初步报告

国际申请号

PCT/CN 2003/001092

V. 按条约 35 (2) 关于新颖性、创造性或工业实用性的意见；支持这种理由的引证和解释

1. 意见

新颖性(N)	权利要求 1-9	是
	权利要求	否
创造性(IS)	权利要求 1-9	是
	权利要求	否
工业实用性(IA)	权利要求 1-9	是
	权利要求	否

2. 引证和解释（细则 70.7）

现有技术没有公开权利要求 1—9 所要求保护的技术方案，同时结合现有技术也不能显而易见地得出本申请权利要求 1—9 所要求保护的从细菌发酵液中直接分离提纯胞内聚羟基脂肪酸酯的方法，因此权利要求 1—9 所要求保护的技术方案具有新颖性和创造性，符合 PCT 条约 33（2）和 33（3）款的有关规定。

权利要求 1—9 所要求保护的从细菌发酵液中直接分离提纯胞内聚羟基脂肪酸酯的方法具有工业实用性，符合 PCT 条约 33（4）款的规定。

从细菌发酵液中直接分离提纯胞内聚羟基脂肪酸酯的方法

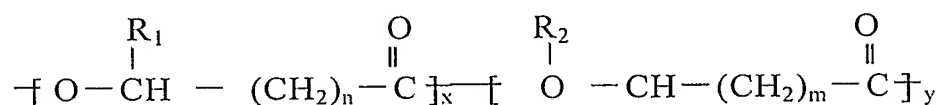
技术领域

本发明属于生物工程下游后处理技术领域，具体涉及细菌发酵产物的提取分离，更具体涉及胞内聚羟基脂肪酸酯的直接提取分离方法。

发明背景

聚-β-羟基脂肪酸酯 (Poly-β-Hydroxyalkanoates, 简称 PHAs) 是一类由特定微生物在特殊的生长条件下在胞内积累的生物聚酯，

PHAs 的通式为：



其中，n,m 为 1—4 的整数，通常为 1，即 3-羟基脂肪酸 (3-HAS)；

R₁、R₂ 为取代或未取代的饱和或不饱和的直链或支链 C₁₋₁₂ 烷基；X、Y 不能同时为 0，X、Y 的大小决定了该组份在共聚物中的含量。一般，PHAs 的重均分子量在 100—400 万 Da 之间。

PHAs 的物理性质类似于聚丙烯，但由于它具有生物降解性、生物相容性、压电性、光学活性等普通石油化工树脂所不具备的特性，因此在工业、农业、医学、卫生、食品、电子等领域具有广阔的应用前景。

目前国际上 PHAs 的大规模工业化生产仍未实现，其主要原因是成本较石油化工树脂高得多。PHAs 成本主要包括原料成本和分离提纯成本。原料成本的高低取决于菌种的生产效率及所采用的发酵工艺，而分离提纯成本则主要取决于采用的工艺。目前的提取工艺是首先采用高速离心机将细胞从发酵液中分离出来，再对分离后的湿菌体中的 PHAs 进行提纯，一般采用的提纯方法是有机溶剂萃取法、化学试剂法、

表面活性剂+酶法等。这些方法或是成本高、或是污染严重,难以实现工业化生产。公开号 CN1328160A 的发明专利申请公开了一种从含有聚羟基烷酸酯的细胞发酵液中直接提取聚羟基烷酸酯的一步提取分离方法。但该方法必须采用大量的次氯酸钠,使操作环境恶劣、污染严重,由于废水处理而增加成本,并且对提取产物 PHAs 的分子量有极大的剪切降解作用,影响产品品质。

中国专利 CN119067A 公开了一种从细菌菌体中分离提纯细菌胞内聚羟基脂肪酸酯的方法。该方法的提取过程中有两步操作需要把菌体从发酵液中分离出来,但由于细菌的菌体非常的细小(几个微米),而且发酵液又有一定的粘度,因此必须采用分离因素高达 6000 以上的高速离心机才能将其从发酵液中分离出来,这在工业化大生产中将很难实现或将使投资额大大增加。这是 PHAS 类材料大规模工业化生产的瓶颈。该方法还需要使用价格高昂的蛋白酶进一步处理分离的产物,将增加产品的成本。

中国专利 CN1171410A 提供的提取方法,与专利 CN1190674A 相同,也需要采用高速离心机,同时,该方法还提出了要把离心后的分离物进行冷冻干燥,这两步都很难在大规模工业化中实施。以一个年产仅十万吨 PHAS 材料的工厂为例,每天需高速离心处理的发酵液约 3000 吨-4000 吨,冷冻干燥需处理的量约 600 吨-800 吨,如此大量的半成品需要冷冻干燥,其工业成本将非常高。产物最后还需采用大量的有机溶剂洗涤,这会造成操作环境的污染并增加产品成本。

美国专利 US4910145A 提供的是一种使用酶和表面活性剂来分离提取 PHAS 类材料的方法,由于细菌细胞壁和膜的成分非常复杂,不是一种酶即可分解完全的,必须采用多种的复合酶才有效果,而不同的酶其最佳的作用条件如 PH, 温度等是不同的,因此在处理时工艺较复杂,而且,该方法首先要把发酵液加热到 80℃ 以上,这将消耗巨大的能量,同时,酶制剂的价格都比较高,因此该法的分离成本较高且产品纯度不高。

因此，本发明的目的是提供一种可以有效降低分离提纯成本、减少污染、适合于工业化生产的 PHAs 提取方法。

5 发明内容

本发明提供一种从细菌发酵液中直接分离提纯胞内聚羟基脂肪酸酯的方法。本发明的方法包括以下步骤：

- (1) 用物理方法对发酵液进行细胞破壁预处理；
- (2) 将经预处理的发酵液 pH 值调节至碱性；
- 10 (3) 加入阴离子表面活性剂，搅拌；
- (4) 分离提取反应液中的凝聚沉淀物；
- (5) 洗涤、干燥，

其中，物理方法指机械粉碎和超声波粉碎；而调节 pH 和加入表面活性剂的顺序可以互换。所述的机械粉碎可以是珠磨机研磨或高压
15 均质处理。

步骤 (3) 中除了加入阴离子表面活性剂外还可加入凝聚剂。

本发明方法中，细胞破壁所用的机械粉碎可以是珠磨机研磨。

预处理后的发酵液 pH 调节在 8~13。调节 pH 所用的碱性物质可以是 NaOH、Na₂CO₃、NaHCO₃ 等固体或水溶液或氨水等。

20 本发明所用的阴离子表面活性剂可以是烯基磺酸盐 (AOS)、脂肪醇硫酸盐、脂肪醇聚氧乙烯醚硫酸盐 (AES)、脂肪醇聚氧乙烯醚 (AEO)、烷基酚聚氧乙烯醚等，其用量为发酵液的 0.5%~20%(W/V)。

本发明方法中可以加的凝聚剂有聚丙烯酸钠、变性淀粉、聚胺等。凝聚剂的用量为发酵液的 0.5%~20% (W/V)。

25 加入阴离子表面活性剂和凝聚剂后搅拌反应的温度在 10℃~70℃，反应时间为 5~60 分钟。

分离提取反应液中凝聚沉淀物的方法可以采用离心、压滤、真空抽滤等。

本发明适用处理对象广泛，可应用于各种含聚羟基脂肪酸酯的细菌及其变异株及基因工程菌等发酵液的分离提纯。所适用的细菌种属主要包括：产碱杆菌属 (Alcaligenes)、假单胞菌属 (Pseudomonas)、固氮菌属 (Azotobacter)、红螺菌属 (Rhodospirillum)、甲基营养菌属 (Methylobacterium) 和芽孢杆菌属 (Bacillus) 等。

本发明方法对发酵液中细胞干重及其中的 PHAs 含量的要求不高。本发明工艺简单、成本低、提取收率高。并且大大减少污染，从而能够实现大规模工业化生产。

具体实施方式

下面用实施例对本发明作进一步描述，但这些实施例并不构成对权利要求范围的任何限制。本领域技术人员在得到本说明书的揭示后对本发明所作的任何修改和变动都将落在本说明书所附权利要求的范围内。

实施例 1

取 *Alcaligenes entrophus* 突变株 65-7 的发酵液 1000ml，细胞干重为 142 克/升，PHBV 含量 78.5%，用珠磨机 (530 转/分，0.1mm 钢珠) 预处理 40 分钟，用 30% 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 12，加入 13 克十二烷基硫酸钠，调节反应温度至 32℃，搅拌反应 5 分钟，用滤纸抽滤，所得凝聚沉淀物用水洗涤至洗液呈中性，70℃ 左右烘干至恒重。所得产品纯度为 98.2%，重均分子量 5.2×10^5 Da，提取收率 85.2%。抽滤的废水经厌氧、好氧处理后，其 COD、BOD 分别达到 800mg/l 和 30mg/l，达到国家排放标准。

实施例 2

取 *Alcaligenes entrophus* 菌发酵液 100ml，细胞干重 147g/l (其

中 PHBV 含量为 75.2%)，用超声波（功率 1500W）破壁 20 分钟，用 30%NaOH 溶液调节 pH 值至 8，加入 0.5g 十二烷基硫酸钠和 5g 聚丙烯酸钠，调节反应温度至 70℃，搅拌反应 30 分钟。然后，用滤纸抽滤，将所得凝聚沉淀物用水洗涤，洗涤至洗液呈 pH 中性后置于 70℃
5 左右烘箱内干燥至恒重。所得产品纯度 93.2%，分子量 4.1×10^5 Da，提取收率 80.3%。

实施例 3

取 *Alcaligenes entrophus* 菌发酵液 50ml，细胞干重 102g/l（其中 PHB 含量为 60%），用珠磨机（560 转/分，0.1mm 钢珠）破壁预处理 30 分钟，用 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 溶液调节 pH 值至 13，加入 10g 十二烷基硫酸钠和 10g 变性淀粉，调节反应温度至 10℃，搅拌反应 10 分钟，用离心机（分离因素为 600）分离，将所得凝聚沉淀物用水洗涤，洗涤至洗液呈中性后置于 70℃左右烘箱内干燥至恒重。所得产品纯度 98.2%，
15 分子量 4.4×10^5 Da，提取收率 87%。

实施例 4

取 *Alcaligenes entrophus* 突变株 65-7 的发酵液 500ml，细胞干重为 135 克/升，PHB 含量 75.5%，将其置入特制容器中，升压至
20 60Mpa，10 分钟后快速释放压力，收集液体后重复 2 遍。处理后的发酵液用 30%氢氧化钠溶液调节 pH 值至 10，加入 9 克十二醇聚氧乙烯醚硫酸钠，调节反应温度至 38℃，搅拌反应 8 分钟，用滤纸抽滤，所得凝聚沉淀物用水洗涤至洗液呈中性，70℃左右烘干至恒重。所得产品纯度为 96.7%，重均分子量 4.2×10^5 Da，提取收率 81.5%。

25

实施例 5

取 *Alcaligenes entrophus* 菌发酵液 100L，细胞干重 154g/l（其中 PHBV 含量为 80.5%），用超声波（功率 2800W，连续处理）破壁 40 分钟，用 30%NaOH 溶液调节 pH 值至 11，加入 10 kg 十二烷基硫酸钠

和 0.5kg 聚丙烯酸钠，调节反应温度至 50℃，搅拌反应 60 分钟，用压滤机压滤，将所得凝聚沉淀物用水洗涤，洗涤至洗液呈 pH 中性后置于 70℃左右烘箱内干燥至恒重。所得产品纯度 97%，分子量 5.3×10^5 Da，提取收率 84%。

5

实施例 6

取 Pseudomonas 菌的发酵液 100ml，细胞干重为 86 克/升，PHBV 含量 61.5%，用珠磨机（560 转/分，0.1mm 钢珠）预处理 50 分钟，用 30%氢氧化钠溶液调节 pH 值至 11，加入 3 克十二烷基硫酸钠，调节反应温度至 24℃，搅拌反应 10 分钟，用滤纸抽滤，所得凝聚沉淀物用水洗涤至洗液呈中性，70℃左右烘干至恒重。所得产品纯度为 94.2%，重均分子量 3.2×10^5 Da，提取收率 71.2%。

权 利 要 求 书

1. 从细菌发酵液中直接分离提纯胞内聚羟基脂肪酸酯的方法，其特征在于包括以下步骤：

- 5 (1) 用物理方法对发酵液进行细胞破壁预处理；
 (2) 将经预处理的发酵液 pH 值调节至碱性；
 (3) 加入阴离子表面活性剂，搅拌反应；
 (4) 分离提取反应液中的凝聚沉淀物；
 (5) 洗涤、干燥；

10 其中，物理方法指机械粉碎和超声波粉碎，所述的机械粉碎是珠磨机研磨或高压均质处理；而调节 pH 和加入表面活性剂的顺序可以互换。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其中步骤 (3) 还可加入凝聚剂。

15 3. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述所述机械粉碎可以是珠磨机研磨。

4. 如权利要求 1 所述的方法，其中预处理后的发酵液 pH 调节在 8~13。

5. 如权利要求 1 或 4 所述的方法，其中调节 pH 所用的碱性物质选自 NaOH、 Na_2CO_3 、 NaHCO_3 固体/水溶液和氨水。

20 6. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述阴离子表面活性剂选自烯基磺酸盐、脂肪醇硫酸盐、脂肪醇聚氧乙烯醚硫酸盐、脂肪醇聚氧乙烯醚和烷基酚聚氧乙烯醚，其用量为发酵液的 0.5%~20% (W/V)。

7. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述凝聚剂选自聚丙烯酸钠、变性淀粉和聚胺，其用量为发酵液的 0.5%~20% (W/V)。

25 8. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述搅拌反应的温度在 10℃~70℃，时间为 5~60 分钟。

9. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述分离提取反应液中凝聚沉淀物的方法选自离心、压滤和真空抽滤。